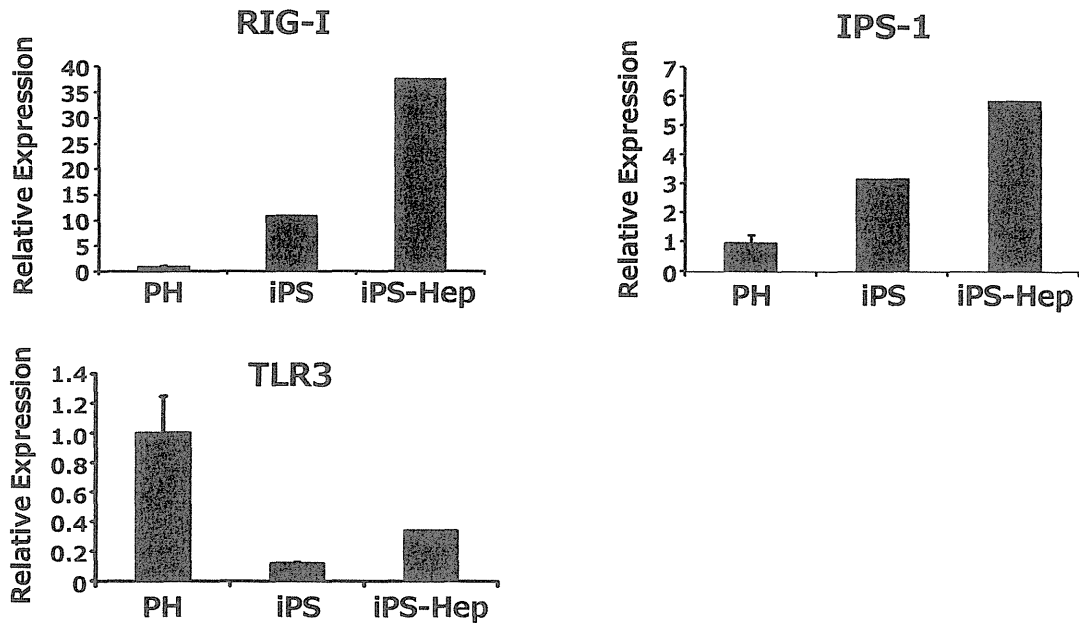


(A) Tic



(B) Dotcom

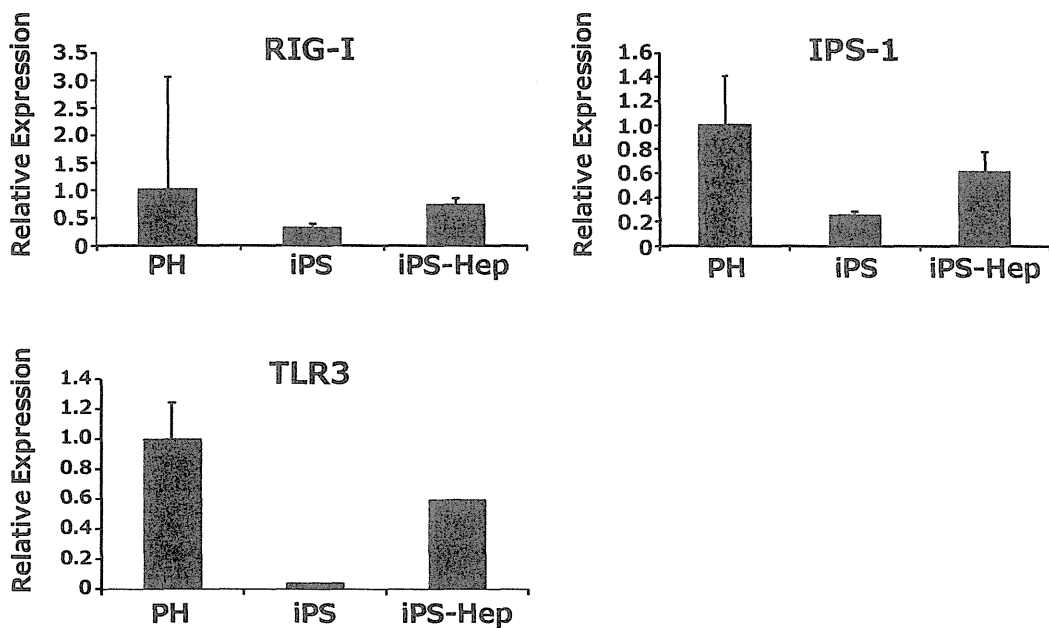


Fig. 4 Expression levels of RIG-I, IPS-1, and TLR3 in iPS cell-derived hepatocytes. (A) Tic, (B) Dotcom. Total RNA was recovered from the cells. mRNA levels of RIG-I, IPS-1, and TLR3 were determined by real-time RT-PCR analysis. PH; human primary hepatocytes.

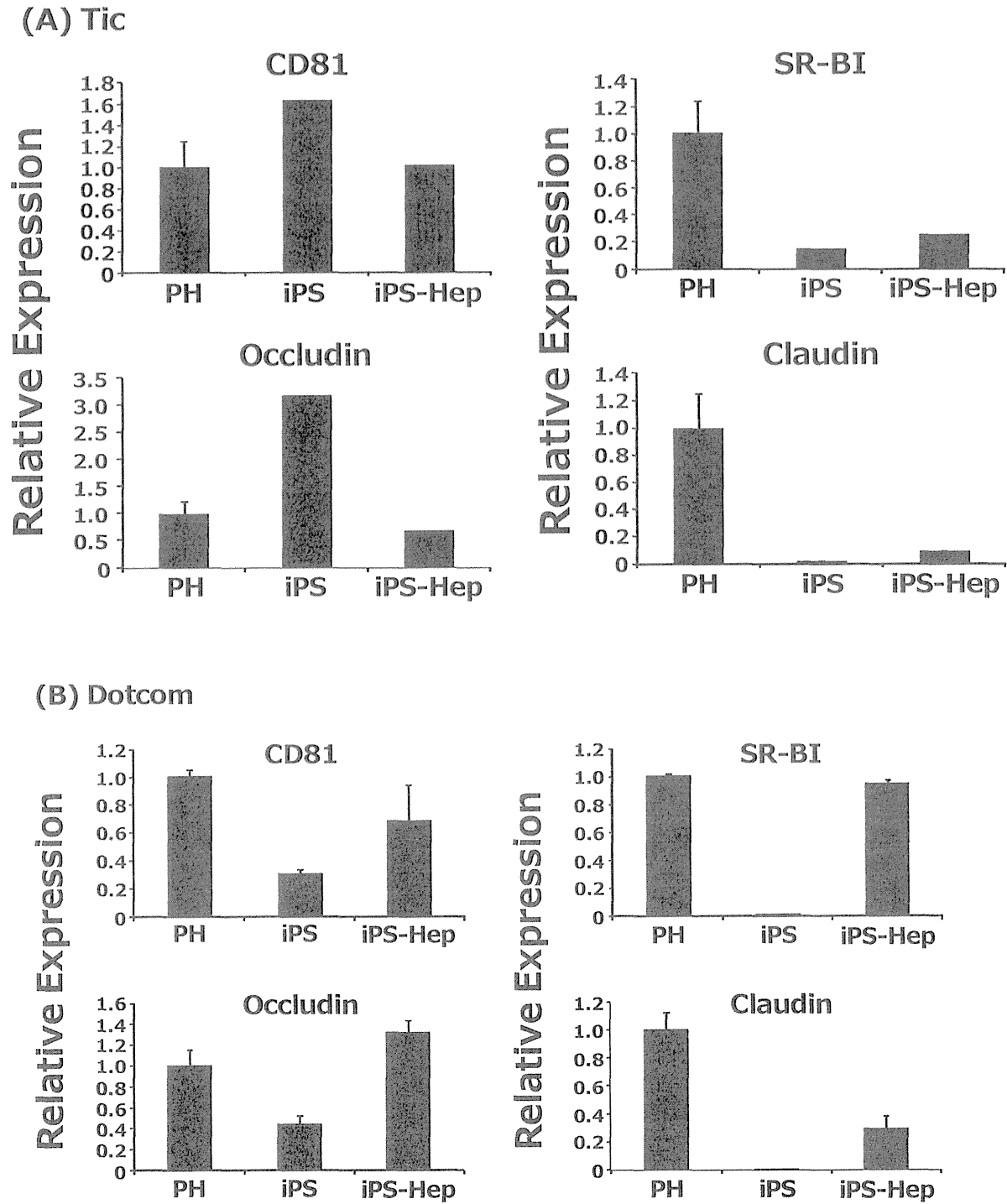


Fig.5 Expression levels of HCV receptors on iPS cell-derived hepatocytes. (A) Tic, (B) Dotcom. Total RNA was recovered from the cells. mRNA levels of HCV receptor genes were evaluated by real-time RT-PCR analysis. PH; human primary hepatocytes, iPS-Hepa; iPS cell-derived hepatocytes.

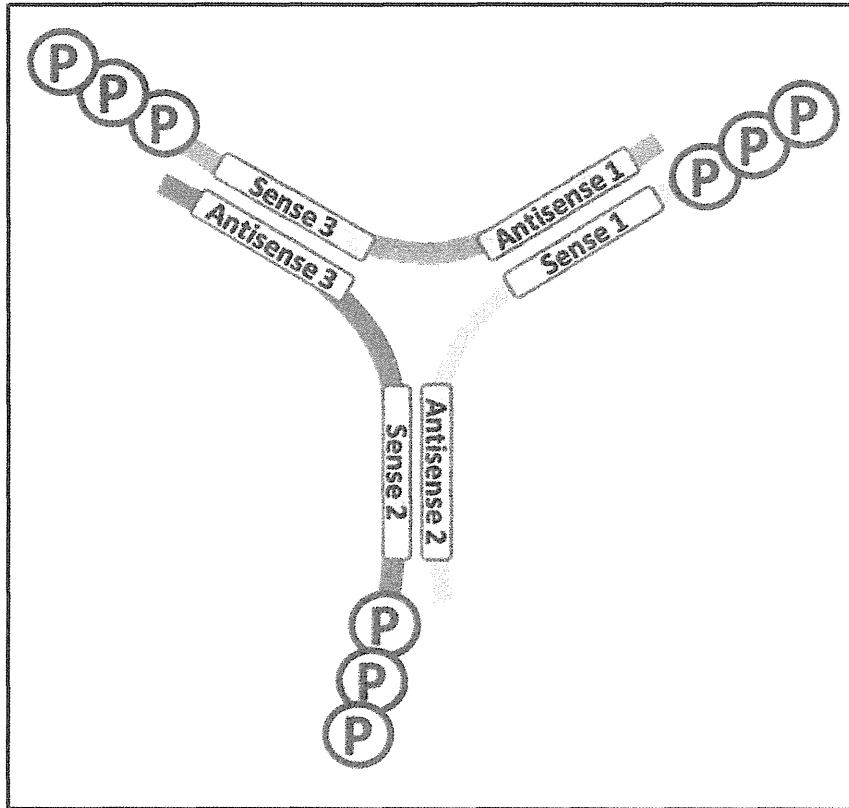


Fig. 6 Model structure of trimeric triphosphate siRNA (3pt-siRNA)

「抗 C 型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ高機能型核酸

医薬の創製に関する研究」

総括研究報告書

miR-122a に対する阻害能と I 型インターフェロン誘導能を兼ね備えたアンチ

センスオリゴヌクレオチドの開発

分担研究者 櫻井 文教

大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

C型肝炎はC型肝炎ウイルス (HCV)の慢性感染によって引き起こされる疾患であり、高効率に肝硬変や肝臓に移行することから大きな社会問題となっている。現在 C 型肝炎治療薬としては、Interferon (IFN)およびリバビリンが第一選択薬であるが、HCV の感染・増殖を規定する細胞側因子を標的とした新規治療薬の開発に期待が寄せられている。最近、肝臓特異的 microRNA (miRNA)である miR-122a が HCV の感染・増殖を規定する新たな細胞側因子であることが報告された。miR-122aはHCVゲノムの5'非翻訳領域に存在する部分的相補配列に結合することにより、HCVゲノムの安定化および翻訳を促進し、HCVの感染を正に制御している。従って、miR-122a を高効率かつ特異的に阻害できれば、HCV の感染を阻害できると考えられる。実際に、miR-122a のアンチセンスオリゴヌクレオチド (Antisense oligonucleotide; ASO)が抗 HCV 薬として開発され、臨床試験が行われている。一方で ASO などの核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫を活性化しないように設計されており、患者自身の免疫能を十分に活用できていない。核酸医薬品においても、自然免疫活性化能を付与し IFN 産生を誘導可能になれば、ASO 本来の HCV 感染抑制機構に加えて、IFN による抗 HCV 活性を誘導することが可能となり、さらに高い治療効果を誘導できるのではないかと考えた。これまでの研究により、細胞質において非自己 RNA を認識する RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I)を活性化させると高効率に IFN 産生を誘導できることが報告されている。RIG-I は、5'末端に 3 リン酸基を持つ二本鎖 RNA と高い親和性を有することから、本研究では miR-122a のアンチセンス配列に RIG-I に結合可能な 5'末端に三リン酸基をもつ二本鎖 RNA をつなげた新規 ASO である LNA122-DS を開発し、LNA122-DS の miR-122a 阻害能、I 型や III 型 IFN 誘導能および HCV 増殖抑制効果について明らかにした。

研究代表者

山口 朋子 独立行政法人医薬基盤研究所
研究員

協力研究者

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科
教授

立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科
助教

岡本小百合 大阪大学大学院薬学研究科
実験補助員

林 晃平 大阪大学大学院薬学研究科
大学院生

Ong Tyng Tyng 大阪大学大学院薬学研究科
大学院生

坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科
教授

福原 崇介 大阪大学微生物病研究所
助教

松浦 善治 大阪大学微生物病研究所
教授

加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬総合研究科
教授

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus; HCV)は、1989 年に米国の Choo らによって発見され、それまで非 A 非 B 型肝炎と診断されていた患者の 9 割以上が HCV 感染患者であることが明らかとなった。現在では我が国において 200 万人、全世界では 1 億 7 千万人の C 型肝炎患者がいるとされている。HCV は感染しても 30%は急性肝炎として治癒するものの、残り 70%は慢性肝炎となり 20-30 年の歳月をかけて肝硬変、肝臓へと移行する。現在、C 型肝炎治療薬の標準治療薬はペグ化 1 型インターフェロン (PEGylated interferon; PEG-IFN)とリバビリンの併用療法である。両薬剤併用により著効率 (Sustained virological response (SVR) 率; 治療終了後 6 ヶ月の時点ま

で HCV の RNA ゲノムが検出されない状態が持続している割合)は飛躍的に向上したが、難治性とされる遺伝子型 1b・高ウイルス量症例では、PEG-IFN とリバビリンの併用でも SVR 率は 50%であり、半数の症例で HCV ゲノムを排除できないことから、新規 C 型肝炎治療薬の開発は急務である。

近年になり HCV の増殖に関与する新規細胞内因子として、肝臓特異的な microRNA (miRNA) である miRNA-122a が同定された。miR-122a は、肝細胞において 50000 コピー/cell も発現しており、肝細胞中の全 miRNA の約 70%を占めている。この miR-122a は HCV ゲノムの 5'非翻訳領域に存在する部分的相補配列に結合し、HCV の感染・増殖を正に制御することが報告されている。HCV ゲノムの 5'非翻訳領域にある miR-122a の部分的相補配列は、全ての HCV 遺伝子型で保存されているため、日本人の約 7 割を占める遺伝子型 1b でも、miR-122a を阻害すれば HCV に対して抑制的に働くことが期待される。このような背景の中で、デンマークのサンタリス社により、C 型肝炎治療薬として miR-122a のアンチセンスオリゴヌクレオチド (Antisense oligonucleotide; ASO) が開発され、現在第二相臨床試験まで進んでいる。この miR-122a に対する ASO は、世界初の microRNA を標的とした治療薬として注目されている。

一方で ASO や small interfering RNA (siRNA) などの従来用いられてきた核酸医薬品は、副作用をさけるために IFN 産生を誘導しないように設計されている。しかしながら、C 型肝炎治療薬として IFN 製剤が使用されていることを考慮すると、核酸医薬品においても自然免疫活性化能を付与し I 型 IFN 産生を誘導可能になれば、miR-122a による HCV 感染抑制機構に加えて、I 型 IFN による抗 HCV 活性を誘導することが可能となり、さらに高い治療効果を誘導することが期待される。これまでの研究により、細胞質において非自己 RNA を認識する RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-I) を活性化させると高効率に I 型 IFN 産生を誘導できることが報告されている。また RIG-I は、5'末端に 3 リン酸基を持つ二本鎖 RNA と高い親和性を有することが知られている。さらに近年になり、RIG-I に認識された RNA はストレス顆粒に蓄

積されることが報告され、HCV ゲノムも RIG-I に認識されストレス顆粒に移行することが報告された。また miR-122a も Argonaute2 と複合体 (RNA induced silencing complex; RISC) を形成し、ストレス応答時にはストレス顆粒に移行することが知られている。以上の報告から、HCV ゲノムは細胞内でストレス顆粒に於いて miR-122a と結合し、安定化及び翻訳を促進していると考えられる。従って miR-122a に対する ASO を効率良くストレス顆粒に送達することが可能であれば、従来の miR-122a 阻害剤よりも高効率に HCV ゲノムに結合する miR-122a を阻害可能であることが推察される。

そこで我々は、従来の miR-122 に対する ASO よりも高い抗 HCV 活性を付与するために、miR-122a のアンチセンス配列に RIG-I に結合可能な 5'末端に三リン酸基をもつ二本鎖 RNA をつなげた新規 ASO を作製した。これにより IFN 産生誘導に加えて、新規 ASO をストレス顆粒に誘導することにより高効率に HCV ゲノムに結合する miR-122a を阻害することが可能であると考えられる。そこで H24 年度は、作製した新規 ASO である LNA122-DS における miR-122a の阻害能および IFN 産生誘導能を検討した。H25 年度は、HCV 感染を高効率に抑制可能か検討した。さらに、H26 年度は、LNA122-DS の自然免疫活性化機構ならびに 3 型 IFN 発現誘導について検討した。

B. 研究方法

1. microRNA 阻害能と I 型インターフェロン誘導能を持つアンチセンスオリゴヌクレオチドの作製

5'末端に三リン酸基をもつ一本鎖 RNA (3pssRNA) を合成するために、*in vitro* 転写をする際の Template となる T7 プロモーターを有した合成オリゴ DNA を作製した。作製した合成オリゴ DNA および MEGAscript kit (ambion) を用いて 3pssRNA の合成を行った。合成した 3pssRNA を 15%ポリアクリルアミドゲルを用いて Native-PAGE を行ったのち目的のバンド位置の RNA を切り出し、ポリアクリルアミドゲルから RNA を回収した。回収した 3pssRNA と miR-122a に対する相補配列を有した ASO を等量で混合した後、アニーリングし LNA122-DS を作製した。

miR-122a に対する相補配列は、サンタリス社が臨床試験を進めている ASO と同一の配列を用いた。Locked nucleic acid (LNA) による修飾部位(塩基)についてもサンタリス社の ASO を同じ部位を LNA とした。目的の二本鎖 RNA が形成されていることを確認するために、上記の同じ条件で Native-PAGE を行った (Fig.2a)。

2. LNA122-DS による miR-122a の阻害能についての検討

Huh-7 細胞を 96well plate (1.0×10^4 cells/well) に播種し 24 時間インキュベートした後、Transfection を行った。具体的には、miR-122a に対する完全相補配列 2 コピーをウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の 3'非翻訳領域に挿入した psicheck-122aT およびコントロールプラスミド (psicheck-control) を、それぞれ各種 ASO とともに Co-Transfection した。Transfection 後 48 時間培養し、Dual luciferase reporter assay system を用いてホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。各 well のホタルルシフェラーゼ活性値で補正することにより、相対的なウミシイタケルシフェラーゼ発現量とした。

3. LNA122-DS の I 型インターフェロン誘導能の解析

PH5CH8 細胞は岡山大学・加藤宣之先生よりご供与頂いた。PH5CH8 細胞を 12well plate に 5×10^5 cell/well で播種し、24 時間後に、100 nM で各種 ASO を Transfection した。その後、細胞から total RNA を回収、DNase I で処理したのちに、逆転写を行った。得られた cDNA を鋳型として定量的 RT-PCR を行い、各種遺伝子の mRNA 発現量の測定を行った。このとき、内部標準として GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) mRNA 量の測定も同時に行った。また、ASO による I 型 IFN 産生誘導における濃度依存性を検討するため、0.01 nM ~ 100 nM で LNA122-DS を Transfection し、12 時間後に RNA を回収した。また ASO による I 型 IFN 産生誘導における経時変化に関しては、100 nM で LNA122-DS をトランスフェクション後、経時的に RNA を回収し、上記と同様に定量的

RT-PCRを行った。

さらにI型IFN産生がRIG-I経路依存的に誘導されるかどうかを検討するため、siRNAを用いてRIG-Iをノックダウンした。具体的には、12well plateに播種後、RIG-IIに対するsiRNAとNegative Control siRNAをそれぞれ100 nMでTransfectionしたのち、48時間後にLNA122-DSを100nMでTransfectionした。LNA122-DSをTransfection後12時間培養したのちにRNAを回収し、定量的RT-PCRによりI型IFN発現量を測定した。

LNA122-DSの脱リン酸化処理は、Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)を用いて37°Cで2時間処理することにより行った。その後上記と同様にTransfectionし、定量的RT-PCRによりI型IFN発現量の測定を行った。またI型IFN誘導についてLNA122-DSの二本鎖RNA部分の長さ依存を検討するために、19bpから25bpの二本鎖RNA領域を持つASOを作製し、それぞれ100nMでTransfectionし、12時間後にRNAを回収しI型IFN発現量を測定した。

またタンパクレベルでのI型IFN産生誘導の解析を行うために、PH5CH8細胞を12well plateに播種し、24時間後に100nMでASOをTransfectionした。Transfection24時間後に培養上清を回収し、VeriKine-HS Human IFN- α Serum ELISA kit (PBL)を用いたELISAにより培養上清中のIFN- α 濃度を測定した。

4. Huh7.5.1 1b Feo 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討

Huh7.5.1 1b Feo 細胞(北海道大学・坂本直哉先生より供与)を96 well-plateに 1×10^4 cells/wellで播種した。24時間後、LNA122-DSを含むASOを100 nMでTransfectionした。Transfection48時間後、PBSで細胞をWashしたのち、ピッカジーンLT2.0を100 μ l/wellで加え、室温で10minインキュベートした。その後、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。

5. Hec1B/miR-122 Con1 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討

Hec1B/miR-122 Con1 細胞を12 well plate に 5×10^5 cells/wellで播種し、24時間後にLNA122-DSを含む各種ASOを100 nMでTransfectionした。Transfection24時間後にTotal RNAをIsogenを用いて回収し、定量的RT-PCRによりHCV replicon genome量を定量した。用いたプライマーの配列をTable 2に示す。

6. Hec1B/miR-122 細胞における LNA122-DS による I 型 IFN ならびに IFN-stimulated gene (ISG) の発現解析

Hec1B/miR-122 細胞(大阪大学・松浦善治先生、福原崇介先生より供与)を12 well plate に 5×10^5 cells/wellで播種し、24時間後にLNA122-DSを含む各種ASOを100 nMでTransfectionした。Transfection24時間後にTotal RNAをIsogenを用いて回収し、定量的RT-PCRによりIFNおよび各種ISG mRNA量を定量した。用いたプライマーの配列をTable 2に示す。

7. LNA122-DS による HCVcc 増殖抑制効果に関する検討

Hec1B/miR-122 細胞を24 well plate に 1×10^5 cells/wellで播種し、24時間後、LNA122-DSを含む各種ASOを100 nMでTransfectionした。Transfection4時間後に培地交換とともに、HCV in cell culture (HCVcc; JFH-1 株)をMultiplicity of infection (MOI)0.5で感染させた。Transfection24時間後に、Total RNAを回収し、HCV genome copy数を定量的RT-PCRにより定量した。

8. LNA122-DS による III 型 IFN 発現誘導に関する検討

ヒト肝細胞株 PH5CH8 細胞(岡山大学・加藤宣之先生よりご供与)および Hec1B/miR-122a-Con1 細胞(miR-122aを発現するHec1B細胞(ヒト子宮内膜癌細胞株)にCon1株のHCVレプリコンゲノムを導入した細胞)を12well plateに 5×10^5 cell/wellで播種し、24時間後に、100nMで各種ASOをTransfectionした。その後、細胞からtotal RNAを回収、DNase Iで

処理したのちに、逆転写を行った。得られた cDNA を鋳型として定量的 RT-PCR を行い、各種遺伝子の mRNA 発現量の測定を行った。このとき、内部標準として GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) mRNA 量の測定も同時に行った。

9. LNA122-DS による III 型 IFN 誘導機構に関する検討

ヒト肝細胞株 PH5CH8 細胞を 12well plate に 2×10^5 cells/well で播種するとともに、Reverse Transfection により RIG-I に対する siRNA もしくは Control siRNA を 10 nM で Transfection した。24 時間後に培地交換を行った後、合計 48 時間培養した。その後、LNA122-DS を 100 nM で Transfection し、4 時間後に培地交換を行った。LNA122-DS を Transfection 12 時間後に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により 3 型 IFN mRNA 量を検討した。

10. LNA122-DS による自然免疫活性化が HCV 増殖抑制に及ぼす影響に関する検討

Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に RIG-I もしくは IPS-1 に対する siRNA を 100nM で Transfection した。48 時間後、細胞を 24well plate に 1×10^5 cell/well で播種した。細胞播種 24 時間後、LNA122-DS を 100nM で Transfection し、LNA122-DS を Transfection 24 時間後に HCV レプリコンゲノム量を定量的 RT-PCR により定量した。また LNA122-DS の 5' 末端の 3 リン酸基を Calf Intestine Phosphatase (CIP) 処理により取り除いたのち、Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に Transfection した。24 時間後に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により IFN- β mRNA 量および HCV レプリコンゲノム量を測定した。

C. 研究結果

1. 作製したLNA122-DSのmiR-122a阻害能に関する検討

Huh-7細胞は、ヒト肝がん由来の細胞であり、miR-122aが高発現している細胞として知られている。この細胞にpsicheck-122aTを導入したところ、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の3'非翻訳領域にあるmiR-122aの標的配列にmiR-122aが結合することで、ウミシイタケルシフェラーゼ発現量がpsicheck-control導入群と比較して約5分の1に低下した (Fig.3a)。一方で、psicheck-122aTとLNA122-DSを同時に細胞内導入すると、発現が低下していたウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の発現がpsicheck-controlと同程度まで回復した。miR-122a相補配列を改変したLNA control-DSおよびLNA controlでは、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の発現は回復しなかった。従って、LNA122-DSはmiR-122a阻害能を有することが示された。また、LNA122-DS導入群におけるウミシイタケルシフェラーゼ発現量は、LNA122導入群と同程度まで回復したことから、LNA122-DSはLNA122と同程度のmiR-122a阻害能を有していることが示された。

2. 作製したLNA122-DSのI型IFN誘導能に関する検討

PH5CH8細胞に各種ASOをTransfectionしたところ、LNA122、LNA controlでは有意なIFN- α の発現は観察されなかった (Fig.4a)。また*in vitro* transcriptionにより合成した5'末端に3リン酸基を付与した一本鎖RNA (3pssRNA)でも同様にIFN- α の発現は認められなかった。それに対し、LNA122-DS、LNA control-DSでは、mock群と比較し、約1000倍のIFN- α の発現が認められた。なおIFN- α に関してもLNA122-DSにより発現上昇が認められたが、その発現上昇の程度はIFN- α と比較し、極めて低いものであった (data not shown)。そのため、今後の検討においてはIFN- α に絞って行った。

次にLNA122-DSによるIFN- α 産生における経時変化について検討した。LNA122-DSをTransfectionした時間を0時間とし、経時的にIFN- α の発現量を測定

したところ、Transfection12時間後までIFN- α 発現量は上昇し、24時間後には少し減少した (Fig.4c)。また、LNA122-DSを0.01nMから100nMまで濃度を変えてTransfectionしたところ、1nMから有意なIFN- α の発現が観察され、10nMまでIFN- α の発現量は上昇した。また100nMでは、10nMと同程度のIFN- α 発現量であった (Fig.4b)。

これらのIFN- α の産生がRIG-I依存性かどうかを検討するためにRIG-Iに対するsiRNAを用いてRIG-Iをノックダウンしたところ、LNA122-DSを導入したことにより上昇していたIFN- α 発現量が、約200分の1に低下した (Fig.5)。なお、RIG-Iに対するsiRNAをTransfectionしたところ、RIG-Iの発現がmRNAレベルで約5分の1にノックダウンしたことを確認している (data not shown)。さらにRIG-Iに認識されるために必要である5'末端の三リン酸基をAlkaline Phosphataseにより取り除いたLNA122-DSをTransfectionしたところ、LNA122-DS導入群と比較してIFN- α 発現量が約400分の1に低下した (Fig.6)。

これまでの検討ではLNA122-DSのRIG-Iに認識させる二本鎖RNA部分は23bpであった。この二本鎖RNA部分の長さがRIG-Iを介したIFN- α 誘導に与える影響を検討するため、種々の長さの二本鎖RNA部分有するLNA122-DSをTransfectionしたところ、19bpでも有意なIFN- α の産生が確認されたものの、二本鎖RNAが23bp以上になると顕著にIFN- α 発現量が上昇した (Fig.7)。以上の結果より、LNA122-DSはRIG-Iを介して、I型IFNの発現を誘導することが示された。

3. Huh7.5.1 1b Feo細胞におけるLNA122-DSによるHCVレプリコン抑制効果に関する検討

まずHCVレプリコンRNA発現細胞としてHuh7.5.1 1b Feo細胞を用いてLNA122-DSのHCVレプリコン抑制効果を検討した。Huh7.5.1 1b Feo細胞は、RIG-I遺伝子の変異を有しているためRIG-Iを介したI型IFN産生誘導経路が機能しないことが報告されている。この細胞に各種ASOをTransfectionしたところ、LNA122-DS導入群ではmockと比較して、HCVレプリコンRNAレベル (HCVレプリコンRNA

由来のルシフェラーゼ活性)を 22%まで抑制した。一方、LNA control-DS 導入群あるいは LNA122 導入群では 47%まで HCV レプリコン RNA レベルが抑制されていた。また Huh7.5.1 1b Feo 細胞における IFN- β 誘導を検討したところ、各種 ASO による有意な IFN- β 発現は見られなかった (data not shown)。Huh7.5.1 1b Feo 細胞では RIG-I 経路が機能していないことを考慮すると、LNA122-DS は miR-122a 阻害に加えて、I 型 IFN 産生以外のメカニズムを介してより高い抗 HCV 活性を示したものと考察された。

4. Hec1B/miR-122 Con1 細胞における LNA122-DS による HCV レプリコン抑制効果に関する検討

次に HCV レプリコン RNA 発現細胞として、Hec1b Con1 細胞を用いて実験を行った。予備検討において、HCVcc が感染可能な各種培養細胞に LNA122-DS を作用させたところ、Hec1B/miR-122 細胞でのみ I 型 IFN の産生が認められたことから、本細胞を用いた LNA122-DS の HCV レプリコン抑制効果について検討した。この細胞において LNA122-DS が miR-122a 抑制能があるかどうかを検討したところ、LNA122-DS によって、ウミシイタケルシフェラーゼ発現量が psicontrol 導入群と同程度まで回復したことから、LNA122-DS は Hec1b Con1 細胞においても miR-122a を阻害可能であることを確認した。また LNA122-DS を Transfection したところ、mock と比較して IFN- β 発現量が約 15 倍上昇した。

次に、各種 ASO の抗 HCV 活性 (HCV レプリコン抑制能) を Hec1b Con1 細胞を用いて検討した。LNA122 および LNA control-DS 導入群では、HCV レプリコン RNA 量が mock 群と比較してそれぞれ 47% および 50% に抑制されていた。それに対し、LNA122-DS 導入群では HCV レプリコン RNA 量が 26% まで抑制されていた。

以上の結果より、LNA122-DS は miR-122 を阻害可能であるとともに、I 型 IFN を誘導することで高効率に HCV を抑制可能であることが示された。

5. Hec1B/miR-122 Con1 細胞における LNA122-DS による IFN-stimulated gene (ISG) の発現誘導解析

さらに、各種 ASO 導入後の抗 HCV 活性を持つ ISG の発現変動を定量的 RT-PCR により検討した。Hec1B 細胞は I 型 IFN 受容体を発現していないことが知られている。一方で、ISG は RIG-I/IPS-1 経路によるシグナルにより、各種 IFN regulatory factor (IRF) を介して直接的に発現が誘導されることが報告されている。その結果、IFI6、OAS、ISG56、ISG15 は mock 群と比較して、LNA122-DS 導入群において 5~15 倍発現上昇していた。しかし、IRF9、GBP1、IFI27、IRF1 においては有意な発現上昇は見られなかった。以上の結果より、LNA122-DS は Hec1B/miR-122 Con1 細胞においても効率よく ISG の発現を誘導することが示された。

6. LNA122-DS による HCVcc 増殖抑制効果に関する検討

次に LNA122-DS が HCVcc の感染を抑制可能か検討した。LNA122-DS を Transfection した細胞に HCVcc を作用させたところ、LNA122 では約 40%、LNAcont-DS では約 80% まで HCVcc の増殖を抑制したのに対し、LNA122-DS 作用群では約 90% HCVcc の増殖を抑制していた。以上の結果より、LNA122-DS は HCV レプリコンのみならず、HCVcc の増殖を従来の miR-122 に対する ASO よりも高効率に抑制可能であることが示された。

7. LNA122-DS による III 型 IFN 発現誘導に関する検討

H25 年度までの検討により、LNA122-DS を Transfection することにより I 型 IFN ならびに IFN-stimulated gene (ISG) を誘導可能であることを明らかにしている。そこで H26 年度は LNA122-DS による III 型 IFN (IFN- λ) の発現誘導に関して検討を行った。まず初めに Hec1B/miR-122a-Con1 細胞および PH5CH8 細胞における III 型 IFN 受容体の発現について検討した。III 型 IFN 受容体は、IL10R2 と IFN λ R1 のヘテロダイマーであるが、PH5CH8 細胞の方が Hec1B/miR-122a-Con1 細胞よりも約 6-7 倍高いものの、両細胞において IL10R2 と IFN λ R1 の有意な発現が認められた。

そこで次にLNA122-DS作用後のIII型IFN発現量について検討した。まずPH5CH8細胞においては、IFN- λ 1, 2, 3ともにTransfection 6時間後からmRNA量の有意な上昇が観察され、12時間後にピークを迎え、Transfection前を比較し、1000倍以上の発現上昇が観察された。一方で従来のASOであるLNA122やControl LNA作用群においてはIII型IFN mRNA量の上昇は観察されなかった。またHec1B/miR-122a-Con1細胞では、PH5CH8細胞と比べると発現量は低いものの、LNA122-DSによって全てのIII型IFNにおいて約100倍のmRNAの上昇が観察された。Hec1B/miR-122a-Con1細胞においても従来のASO作用群においてIII型IFNの発現誘導は観察されなかった。以上の結果より、LNA122-DSはI型IFNのみならず、III型IFNを誘導可能であることが示された。

2. LNA122-DSによるIII型IFN誘導機構に関する検討

次にLNA122-DSによるIII型IFNの発現誘導がどのような機構で起こっているか検討することとした。H25年度までの検討において、LNA122-DSによるI型IFNの発現誘導には主にRIG-Iが関与することが明らかとなっている。そこでsiRNAを用いてRIG-Iをノックダウンした細胞にLNA122-DSを導入し、III型IFNの発現量を検討した。その結果、RIG-Iをノックダウンすることで、全てのIII型IFNにおいて1/100以下にmRNA量が減少した。以上の結果より、LNA122-DSによるIII型IFNの発現誘導においてもRIG-Iが主に関与していることが明らかとなった。

3. LNA122-DSによる自然免疫活性化がHCV増殖抑制に及ぼす影響に関する検討

そこで次にLNA122-DSによるHCVレプリコン増殖抑制効果に、LNA122-DSの自然免疫活性化がどの程度関与しているか明らかにするため、RIG-IおよびIPS-1をノックダウンしたHec1B/miR-122a-Con1細胞にLNA122-DSをTransfectionし、HCVゲノム量を定量した。その結果、RIG-IやIPS-1をノックダウンした細胞においても、LNA122-DSによってControl

siRNA作用群と同程度のHCVレプリコンゲノム量の減少が観察された。なお、RIG-IおよびIPS-1のノックダウンのみにおいては明らかなHCVレプリコンゲノム量の変化は観察されなかった。以上の結果より、LNA122-DSは肝細胞において自然免疫を活性化し、従来のASOであるmiR-122aに対するASOより高いHCV増殖抑制効果を示すものの、それにおける自然免疫活性化の寄与は低いことが示唆された。

D. 考察

導入した細胞でmiR-122aを阻害し、かつI型IFNを誘導可能な新規ASOであるLNA122-DSを作製した。Native-PAGEの泳動像において、アニーリングし二本鎖を形成したLNA122-DSのバンドが高分子側に上昇したことから、LNA122-DSは設計通りアニーリングしているものと思われる。なお、アニーリングしなかった一本鎖RNAのバンドも観察されたが、LNA122-DSと比較し極めて少量であった。

次にLNA122-DSのmiR-122aの阻害能について検討した。psicheck-122aTを用いた検討ではLNA122-DSをCo-transfectionすることで、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の発現量をLNA122導入群と同程度まで回復させることができた。今回作製したLNS122-DSは、miR-122a相補配列と二本鎖RNA部分の間に5塩基のスペーサーを入れて繋げているが、今回の結果より、二本鎖RNA部分が立体障害とならずに、LNA122と同程度のmiR-122a阻害活性を有することが明らかとなった。

またPH5CH8細胞を用いてI型IFN産生誘導について検討したところ、LNA122-DSおよびLNA control-DSを導入することで、mockと比較して約1000倍高いIFN- α の産生が誘導されることが示された。一方で、アニーリング前の一本鎖RNA(3pssRNA)では有意なIFN- β 発現は見られず、CIPにより三リン酸基を除いたLNA122-DSでは、有意にIFN- α の発現が低下した。さらにRIG-IをノックダウンしたところIFN- α の発現が低下したことから、今回作製したLNA122-DSはRIG-Iを介してIFN- α の産生を誘導していることが示された。これまでにRIG-Iが効率よくRNAを認識するためには、5'末端に三リン酸基が必要であること、20bp程度の長さが必要であること、blunt endであることなどが報告されている。今回の結果は、過去の報告と一致するものであった。

以上より今年度の研究では、新たに作製したLNA122-DSはmiR-122a阻害能とI型IFN誘導能の両機能を有していることを示した。

H24年度は、LNA122-DSのmiR-122a阻害能ならびにI型IFN誘導能について検討し、LNA122-DSが優れたmiR-122a阻害能およびI型IFN誘導能を有す

ることを明らかにした。そこでH25年度は、実際にHCVの増殖を抑制可能か、HCVレプリコン発現細胞ならびにHCVcc感染細胞を用いて検討した。

まず、従来よりHCVレプリコン発現細胞として広く用いられているHuh7.5.1細胞を基盤したHCVレプリコン発現細胞であるHuh7.5.1 1b Feo細胞を用いて、LNA122-DSの有用性について検討した。Huh7.5.1細胞は、RIG-I遺伝子に変異を有しているため、RIG-Iリガンドを介したI型IFN誘導が起こらない。実際に我々がHuh7.5.1 1b Feo細胞にLNA122-DSを作用させたところ、有意なIFN- β の発現上昇は観察されなかった。しかしながら、LNA122-DSならびにLNAcont-DSは、LNAcontと比較して有意にHCVレプリコンを抑制した。この理由は現在不明であるが、レポーターアッセイによりmiR-122aの阻害能は、LNA122-DSとLNA122で同程度であることから、その他の要因が考えられる。その他の要因としては、二つを考察している。まず一つは、LNA122-DSがProtein kinase R (PKR)を活性化させる経路が考えられる。PKRは二本鎖RNAを認識することで活性化すること、またPKRが抗HCV活性を有することが知られている。従って、LNA122-DSあるいはLNA control-DSの二本鎖RNA部分がPKRを活性化し、HCVレプリコンRNAを抑制したと考えられる。二つ目は、RIG-IIによるLNA122-DSのストレス顆粒への蓄積である。ストレス顆粒とは、細胞が何らかのストレスを受けた際にmRNAおよびRNA結合タンパク質が蓄積して形成される顆粒である。近年RIG-IIにより認識されたRNAがストレス顆粒に蓄積することが明らかとなった。またHCVゲノムもストレス顆粒に留まることが知られている。さらにmiR-122aは、Argonaute 2 (Ago2)に取り込まれたのち、RNA-induced silencing complex (RISC)を形成し、ストレス応答時にストレス顆粒に移行する。従って、RIG-IIに認識されたLNA122-DSがストレス顆粒に移行し、HCVゲノム、miR-122a、LNA122-DSが高濃度にストレス顆粒に集積することで、LNA122導入群よりも有意にmiR-122aを阻害することが可能となり、より高い抗HCV効果をもたらしたものと推察された。上記の可能性については、今後詳細に検討する予定である。

次に、miR-122a阻害とI型IFN誘導によるHCV増殖抑制が同時に評価可能な細胞を探索するため、Huh7細胞以外でHCVccが感染可能な各種細胞株にLNA122-DSを作用させ、I型IFN産生を検討した。その結果、Hec1B/miR-122a細胞(miR-122aを安定発現するHec1B細胞)が唯一I型IFNの発現上昇を示したことから、以後の検討ではHec1B/miR-122a細胞を用いて検討することとした。Hec1B細胞は、I型IFNに対する受容体を発現していないものの、LNA122-DS作用後、IFN- β ならびに各種ISGの発現上昇が観察された。これは、RIG-Iを介したシグナルより、IRFが直接的にISGの発現を誘導したものと考えられる。今回発現誘導されたISGは、すべて抗HCV活性を有することが報告されていることから、これらISGの発現誘導が抗HCV活性につながったものと考えられる。

HCVゲノムから翻訳されるタンパク質の一つであるNS3/4Aはプロテアーゼ活性を有し、RIG-Iの下流にあるアダプター分子であるInterferon- β promoter stimulator-1 (IPS-1)を分解する。従って、HCV感染細胞ではIPS-1が分解されることにより、RIG-I経路が非感染細胞よりも効率良く機能しないことが報告されている。しかし、そのような報告では実際の感染細胞と比較してHCVゲノム量が非常に多いこと、また分解されていないIPS-1も検出されていることから、我々はHCV感染細胞においてもRIG-I経路を介してI型IFNを誘導可能であると考えた。HCVレプリコン細胞では一般的に約 10^4 コピーのHCVレプリコンRNAが存在するのに対し、実際のHCV感染細胞では、臨床検体のHCV感染細胞では10コピー前後であると報告されていることから、実際のHCV感染細胞ではレプリコンRNA発現細胞であるHec1b Con1細胞の結果よりも高いIFN- β 誘導を得られるものと期待される。またLNA122-DSがmiR-122a阻害活性によりHCVゲノム量を抑制すれば、NS3/4Aの発現低下、ひいてはIPS-1の分解が抑制され、RIG-I経路も機能を取り戻すと推察される。

一方で、miR-122aに対するアンチセンス領域と、I型IFNの発現誘導活性を有する二本鎖RNA領域を別々にTransfectionした場合のHCVレプリコン抑制

効率と、LNA122-DSのHCVレプリコン抑制効率は同程度であった(data not shown)。またmiR-122aに対するアンチセンス領域がmiR-122aを阻害する効率と、二本鎖RNA領域のI型IFN誘導効率が異なることから、二つの領域を結合させた形にすることで、どちらかを過剰量細胞内に導入することになる。しかし、二つの領域を結合させた領域にすることで、同一の細胞でmiR-122a阻害とI型IFNならびにISGの発現を誘導することができる。またmiR-122aに対するASOは、リポソームなどのキャリアーを使用せずに単独投与により肝細胞にデリバリー可能である。従って、LNA122-DSもキャリアーなしに単独で肝細胞にデリバリーできるかもしれない。

H26年度はLNA122-DSによるIII型IFNの発現誘導に関して検討を行った。III型IFNはI型IFNを比較すると、非常に多くのmRNA量が発現誘導されてくる。またIII型IFNは肝細胞においても自然免疫活性化によって強く誘導される。これまでもIII型IFNがHCVのみならず、他のウイルス感染症に対しても有効であることが報告されている。しかしIII型IFNの発現誘導機構についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。そこでH26年度はLNA122-DSによるIII型IFN誘導について検討を行った。

これまでにLNA122-DSによるI型IFNの発現誘導には主にRIG-Iが関与していることを明らかにしていることから、III型IFNの発現誘導にもRIG-Iが関与していると考え、RIG-Iの関与について検討した。siRNAを用いてRIG-Iをノックダウンしたところ、LNA122-DSによるIII型IFNのmRNAは大きく減少した。従って、LNA122-DSによるIII型IFNの発現誘導には、RIG-Iが関与していることが示された。これまでに研究により、RIG-Iの下流ではIRF3およびIRF7が活性化すること、III型IFNの発現にはIRF3およびIRF7が関与することが報告されており、今回の結果はそれらの報告と一致するものと思われる。

これまでの検討によりLNA122-DSはmiR-122aを阻害するとともに、I型およびIII型IFNの発現を強く誘導することが示された。またHCVcc(JFH-1株)の感染増殖も、従来のmiR-122aに対するASOと比較し強く抑制した。そこで、LNA122-DSによる強力な

HCV 感染増殖抑制効果において、LNA122-DS による IFN 発現誘導がどの程度寄与しているか検討するため、RIG-I をノックダウンした Hec1B/miR-122-Con1 細胞に LNA122-DS を Transfection し、HCV レプリコンゲノム量を検討した。その結果、RIG-I をノックダウンした細胞においても、Control 細胞と比較し LNA122-DS による HCV 感染増殖抑制効果は同程度であった。IFN の発現誘導が観察されない Huh7.5.1 1bFeo 細胞においても、LNA122-DS は miR-122 に対する ASO よりも高い HCV 増殖抑制効果を示したことを考えると、LNA122-DS はその特徴的な構造から自然免疫活性化や miR-122a 阻害以外のメカニズムを介して HCV 増殖抑制効果を示している可能性が考えられた。例えば TLR3 の関与が考えられる。最近、LNA122-DS と類似した構造を有する核酸医薬品が TLR3 のリガンドとなることが報告された (Matsumoto et al., Nature Commun. 2015)。TLR3 シグナルによっても IRF3 および IRF7 が活性化することから、ひょっとしたら LNA122-DS は主には RIG-I を介して自然免疫を活性化するものの、TLR3 を介した経路も活性化しているのかもしれない。また Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase (PKR) を介したシグナルを活性化している可能性も考えられる。PKR も 5'末端に 3リン酸基を有する二本鎖 RNA を認識して下流のシグナルを活性化する。LNA122-DS による HCV 増殖抑制効果のメカニズム解明に関しては、更なる検討が必要である。

E. 結論

1. miR-122a 阻害能と I 型 IFN 産生誘導可能な新規 ASO である LNA122-DS を作製した。
2. LNA122-DS は、従来用いられてきた miR-122a の阻害剤と同程度の miR-122a 阻害能を有し、

かつ I 型 IFN が産生誘導可能であることを示した。

3. LNA122-DS は、Hec1B/miR-122 細胞において I 型 IFN ならびに ISG の発現を誘導可能であった。
4. LNA122-DS は Hec1B/miR-122 細胞において、HCV レプリコンならびに HCVcc の増殖を抑制可能であった。
5. LNA122-DS は、I 型 IFN の発現を誘導しない Huh7.5.1 1b Feo 細胞においても、従来の miR-122 に対する従来のアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも高い HCV レプリコン抑制効果を示した。
6. LNA122-DS は、主に RIG-I を介して III 型 IFN の発現を誘導することが示された。
7. LNA122-DS による HCV 増殖抑制効果は、miR-122a 阻害や自然免疫活性化以外の経路も存在することが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, **Sakurai F**, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. Type-I IFN signaling is required for the induction of antigen-specific CD8(+) T cell responses by adenovirus vector vaccine in the gut-mucosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 17;425:89-93. (2012)
2. Machitani M., **Sakurai F**, Katayama K., Tachimana M., Suzuki T., Matsui H., Yamaguchi T., Mizuguchi H. Improving the adenovirus vector-mediated RNAi efficiency by lacking the expression of virus-associated RNAs., *Virus Res.*, in press.
3. (序論) **櫻井文教**、近藤昌夫 「ウイルスを利用した医療・創薬研究の新展開-ウイルスは貴重なバ

イオマテリアル-」Yakugaku Zasshi, 133, 289
(2013)

G-2 学会発表

1. 林 晃平, 櫻井 文教, オン ティン ティン, 加藤 宣之, 福原 崇介, 松浦 善治, 立花 雅史, 水口 裕之. C型肝炎治療に向けた microRNA 阻害能とインターフェロン誘導能を併せ持つ新規アンチセンスオリゴの開発. 日本薬学会第133年会. 2013年3月27-30日
2. 林 晃平, 櫻井 文教, オン ティン ティン, 加藤 宣之, 福原 崇介, 松浦 善治, 坂本直哉, 立花 雅史, 水口 裕之. miR-122a 阻害と1型インターフェロン産生を同時誘導可能な新規核酸医薬品によるC型肝炎治療に関する研究. 第29回日本 DDS 学会 2013年7月4, 5日 京都.
3. オン ティン ティン, 櫻井文教, 林晃平, 福原崇介, 松浦善治, 加藤宣之, 坂本直哉, 立花雅史, 水口裕之. 高いインターフェロン誘導能とノックダウン効率を併せ持つ分岐型 siRNA を用いた C型肝炎ウイルス増殖抑制に関する検討. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会 2013年10月12日 京都.
4. オン ティン ティン, 櫻井文教, 林晃平, 福原崇介, 松浦善治, 加藤宣之, 坂本直哉, 立花雅史, 水口裕之. 高いインターフェロン誘導能とノックダウン効率を併せ持つ分岐型 siRNA によるC型肝炎ウイルスの増殖抑制. 第23回アンチセンスシンポジウム, 2013年11月28-29日, 徳島.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

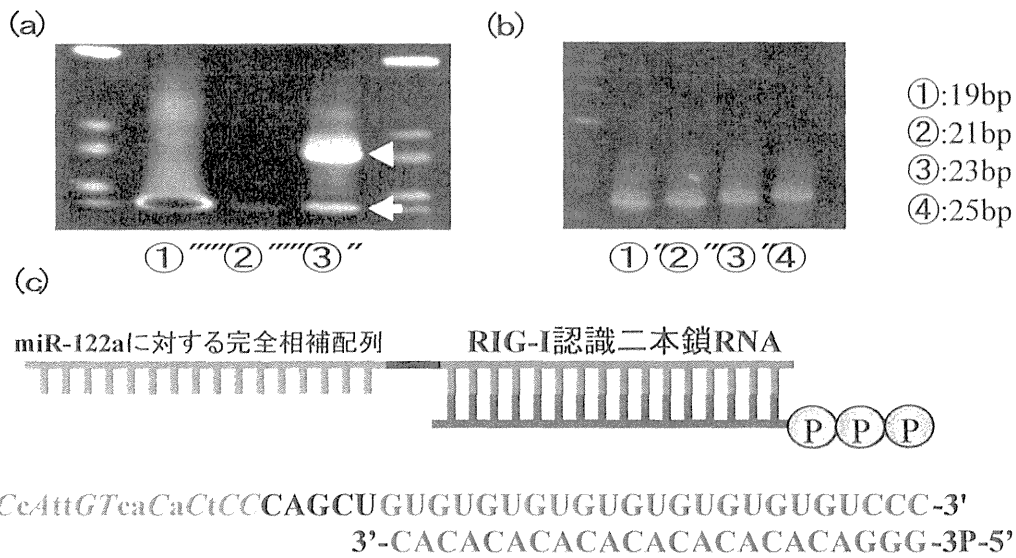


Fig.2 Native-PAGE images of ASOs

(a) Lane 1; ASO containing miR-122a complementary sequences, lane 2; *in vitro* transcribed 5'-triphosphate single-strand RNA (3pssRNA), Lane 3; LNA122-DS. The upper band (arrow head) represents LNA122-DS. The lower band (arrow) represents the 3pssRNA and/or ASO containing miR-122a complementary sequences.

(b) Native-PAGE images of LNA122-DS containing different length of double-stranded RNA region.

(c) A schematic diagram of LNA122-DS. 3P; 5'-triphosphate group. LNA, RNA, and DNA are shown in italic capital, capital, and lower case letters, respectively.

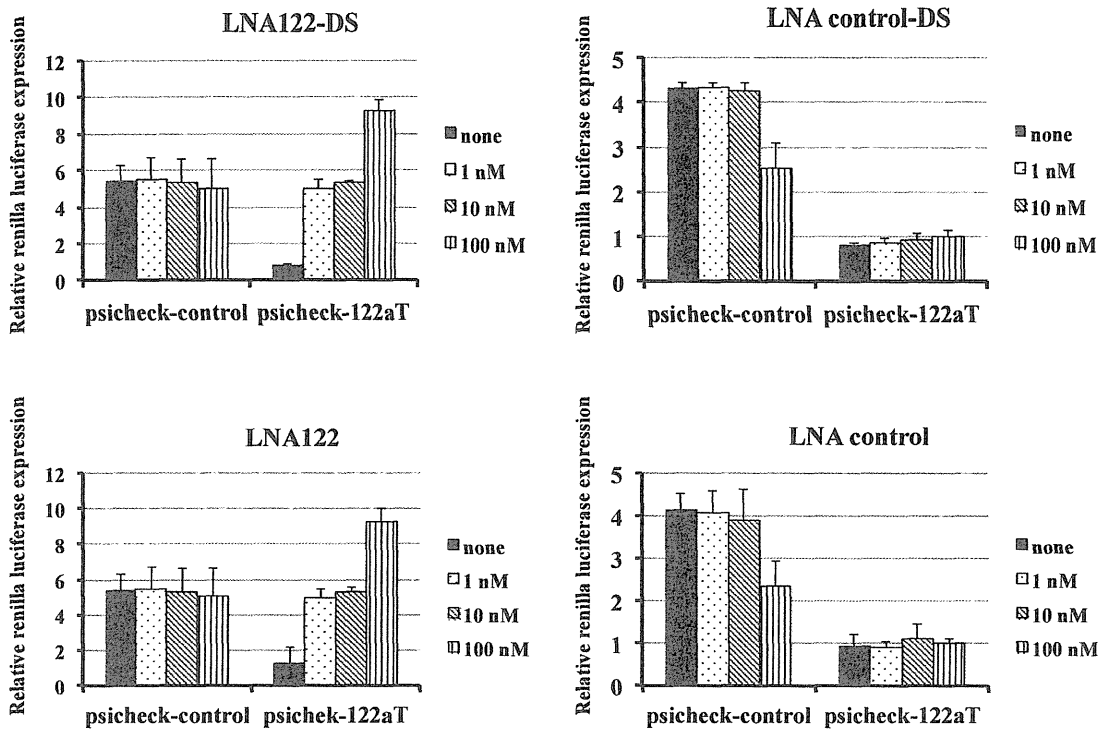


Fig.3 miR-122a inhibition activity of LNA122-DS in Huh-7 cells

Huh-7 cells were co-transfected with ASO and psicheck-122aT or psicheck-control. Forty-eight hrs after transfection, renilla and firefly luciferase activities were determined by chemiluminescence assay. The ratios of renilla luciferase activities to firefly luciferase activities were calculated. The data are expressed as mean \pm S.D. (n=5).

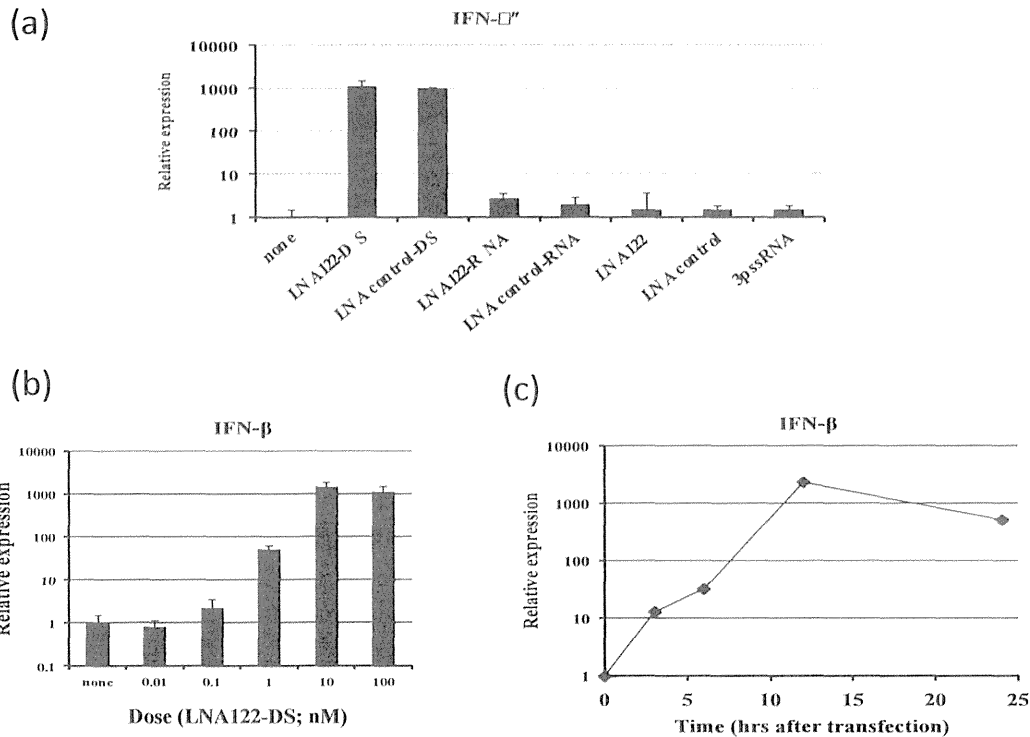


Fig.4 IFN- β mRNA levels in PH5CH8 cells transfected with LNA122-DS

(a) IFN- β mRNA levels induced by various types of ASOs in PH5CH8 cells. PH5CH8 cells were transfected with ASOs at 100 nM. Total RNA was isolated from PH5CH8 cells 12 hrs after transfection. (b) dose-dependent expression of IFN- β mRNA following transfection with LNA122-DS. (c) time course profile of IFN- β expression by LNA122-DS. Expression levels of IFN- β mRNA were determined by quantitative RT-PCR using primers specific for each mRNA. GAPDH mRNA levels were measured as an internal control. The ratios of IFN- β mRNA levels to GAPDH mRNA levels were calculated. Expression levels of IFN- β mRNA in the mock-transfected cells were normalized to 1. The data are expressed as means \pm S.D. (n=4).

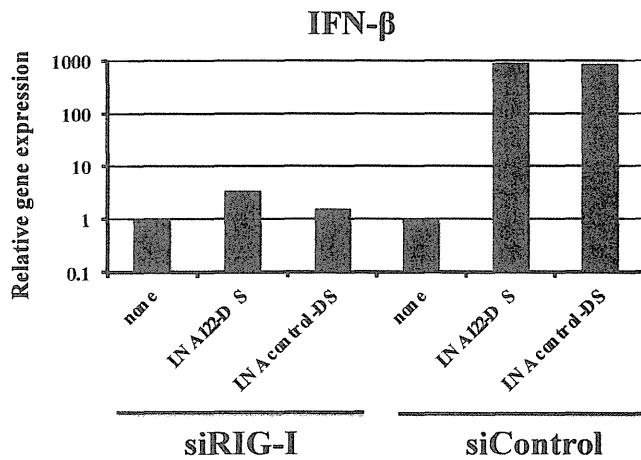


Fig.5 IFN- β mRNA levels in PH5CH8 cells transfected with LNA122-DS after siRNA-mediated knockdown of RIG-I

PH5CH8 cells were transfected with anti-RIG-I siRNA. Forty-eight hrs after transfection with anti-RIG-I siRNA, LNA122-DS or LNA control-DS were transfected at 100nM. Total RNA was isolated 12 hrs after transfection with LNA122-DS or LNA control-DS. Expression levels of IFN- β mRNA were determined by quantitative RT-PCR. GAPDH mRNA levels were measured as an internal control. The ratios of IFN- β mRNA levels to GAPDH mRNA levels were calculated. Expression levels of IFN- β in the mock-transfected cells were normalized to 1. The data are expressed as means \pm S.D. (n=4).

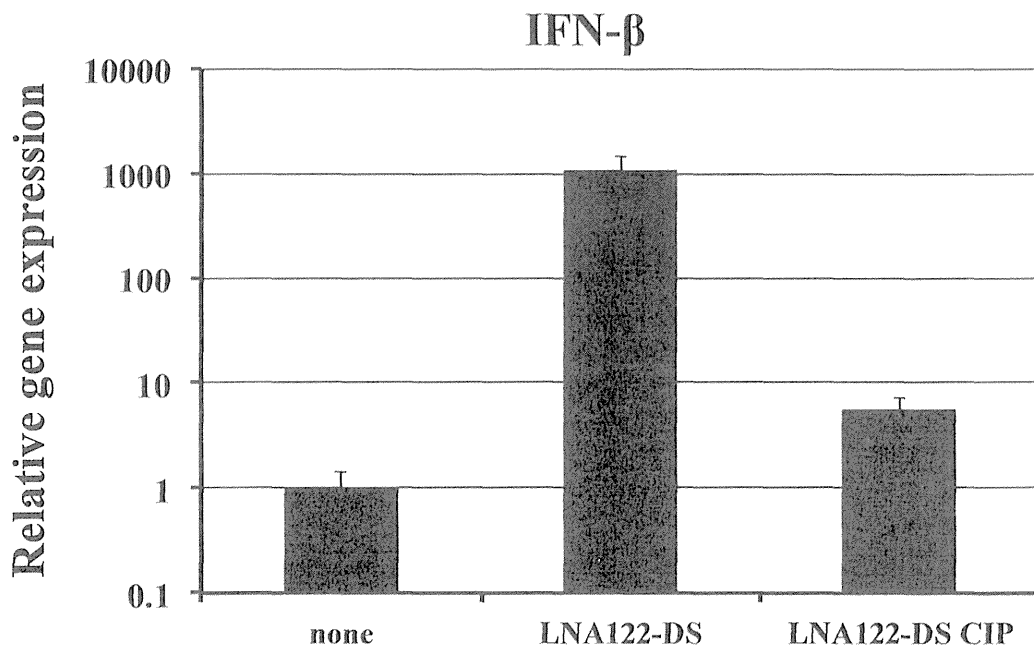


Fig.6 IFN- β mRNA levels in PH5CH8 cells transfected with ASO after CIP treatment

LNA122-DS were treated with CIP for removal of 5'-triphosphate group. PH5CH8 cells were transfected with LNA122-DS following treatment with CIP. Total RNA was recovered from the cells 12 hrs after transfection. IFN- β mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR. GAPDH mRNA levels were measured as an internal control. IFN- β mRNA levels in the mock-transfected cells were normalized to 1. The data are expressed as means \pm S.D. (n=4).